

THESIS

MUNICH

1966

**Das Verhalten des Seruminsulinspiegels
vor und nach Glucosebelastung
bei Schwangeren**

GISELA KRAKAU

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

(Direktor: Prof. Dr. W. Seitz)

und aus der II. Frauenklinik der Universität München

(Direktor: Prof. Dr. R. Fikentscher)

DAS VERHALTEN DES SERUMINSULINSPIEGELS VOR UND NACH
GLUCOSEBELASTUNG BEI SCHWANGEREN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gisela Krakau

aus

Amberg

München 1966

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Priv. Doz. Dr. H. Mehnert

Korreferent: Prof. Dr. W. Seitz

Dekan: Prof. Dr. Dr. R. Zenker

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juli 1966

MEINEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

- I. Einleitung
- II. Patientengut und Methodik
 - A. Patientengut und Durchführung der Blutentnahme
 - B. Prinzip der Insulinbestimmung
 - C. Chemische und biochemische Untersuchungsmethoden
 - 1. Enzymatische Glucosebestimmung
 - 2. Fettgewebismethode zur Insulinbestimmung
 - 3. Diaphragmamethode zur Insulinbestimmung
- III. Ergebnisse
- IV. Diskussion
 - 1. Besprechung des vorliegenden Schrifttums
 - 2. Diskussion der eigenen Ergebnisse
- V. Zusammenfassung
- VI. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

In den vergangenen Jahren sind verschiedene biologische Methoden zur Bestimmung von Insulin im Serum ausgearbeitet worden, die es ermöglichen, Differenzierungen hinsichtlich der Gesamtinsulinaktivität einerseits, und des Anteils des "freien" und "gebundenen" Insulins vorzunehmen.

Alle Autoren, die mit diesen Methoden arbeiteten, ließen jedoch keinen Zweifel daran, daß die biologischen Testverfahren zwangsläufig gewisse Mängel haben und hinsichtlich der individuell ermittelten Absolutwerte eine große Fehlerbreite aufweisen können. Trotz dieser Einschränkungen haben die mit den neuen Insulinbestimmungsmethoden durchgeführten Untersuchungen die Diabetesforschung aus zwei Gründen wesentlich stimuliert: Einerseits war es möglich geworden, Messungen des absoluten Insulingehaltes - oder richtiger der insulinähnlichen Aktivität - durchzuführen und zum anderen gaben die durch die verschiedene Methodik möglichen Differenzierungen der Art des gemessenen Insulins wichtige und neue Einblicke in die Pathogenese der Zuckerkrankheit.

Wie oben erwähnt, wird ein frei in der Blutbahn zirkulierendes Insulin unterschieden von jenem Anteil des Hormons, der offensichtlich an einen Eiweißkörper gebunden ist und nur an bestimmten Geweben wirksam werden kann. Es zeigte sich, daß bei den Diabetikern in den meisten Fällen keineswegs niedrige, sondern sogar erhöhte Spiegel der gesamten insulinähnlichen Aktivität messbar sind, die nach allgemeiner Ansicht auf einen besonders hohen Anteil an gebundenem, biologisch nur teilweise wirksamen Insulin zurückzuführen sind.

Wie man weiß, kann die Schwangerschaft auf Grund der vorwiegend Glucocorticoid-induzierten Umstellung des Stoffwechsels bei vorhandener Diabetesanlage als auslösender Faktor der Zuckerkrankheit wirken; zumindest lassen sich während der Gravidität viele Fälle von latentem Diabetes nachweisen, und manche sogenannte Schwangerschaftsdiabetes stellt einen nicht erkannten Diabetes dar.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit soll sein, das Verhalten der Seruminsulinspiegel vor und nach Glucosebelastung bei schwangeren, glucosurischen Frauen zu prüfen. Dabei sollen Unterscheidungen getroffen werden zwischen Frauen, die mit aller Wahrscheinlichkeit keinen Diabetes mellitus aufweisen und lediglich eine harmlose Schwangerschaftsdiabetes haben, und Schwangeren, bei denen auf Grund der Familienanamnese oder der Geburt übergewichtiger Kinder ein potentieller Diabetes anzunehmen ist. Ferner soll unterschieden werden zwischen den einzelnen Formen des mit unterschiedlicher Methodik ermittelten Insulins.

Besonders der Vergleich zwischen Methoden, mit denen das sogenannte freie Insulin bestimmt werden kann, sollte einen Beitrag zu dem umstrittenen Problem liefern, welche Methodik sich für diese Fragestellung am besten eignet.

Die Bestimmung des Seruminsulinspiegels soll einmal mit der sogenannten Diaphragmamethode und zum anderen mit einem biologischen Test durchgeführt werden, bei dem das Gesamtinsulin und der durch Insulinantikörper unterdrückbare Anteil am Nebenhodenfettgewebe der Ratte bestimmt werden kann.

II. Patientengut und Methodik

A. Patientengut und Durchführung der Blutentnahme

Das Patientengut stammte aus der II. Universitäts-Frauenklinik München (Dir. Prof. Dr. R. Fikentscher). Die Auswahl der schwangeren Patientinnen erfolgte auf Grund einer mit einem Diabetes belasteten Familienanamnese oder der Geburt übergewichtiger Kinder jeweils in Verbindung mit einer Schwangerschafts-glucosurie, jedoch ohne pathologische Glucosebelastungsprobe (insgesamt 11 Frauen). Diese Gruppe wurde verglichen mit 16 Frauen, die lediglich eine Schwangerschafts-glucosurie aufwiesen. Zur Verfügung standen ursprünglich 34 Patientinnen. Die Versuchsergebnisse von vier dieser Patientinnen konnten nicht ausgewertet werden, da die Werte für das gebundene Insulin wesentlich höher als für das gesamte Insulin und somit falsch waren. Von zwei Patientinnen standen nur je zwei Serumproben zur Verfügung (die Nüchtern- und die 60-Minuten-Probe), die wir nur zu Vorversuchen benützten. Die Werte einer Patientin, die eine eindeutig pathologische Glucosebelastungskurve aufwies, wurde nur in der Kasuistik, nicht jedoch in den Abbildungen aufgeführt.

Für die Auswertung blieben also 27 Patientinnen, die eingeteilt wurden in

Gruppe 1 = 16 Patientinnen mit einer Schwangerschafts-glucosurie

Gruppe 2 = 11 Patientinnen, bei denen neben der Schwangerschafts-glucosurie die oben genannten diabetesverdächtigen Befunde zu erheben waren.

Die Glucosebelastung wurde bei den Patientinnen im 6. - 7. Monat ihrer Schwangerschaft durchgeführt. Die Frauen bekamen in einer Einfachbelastung 100 g Glucose in 400 ml Tee gelöst zu trinken. Für die Testseren wurden jeweils 10 ml Blut entnommen und zwar

- a) nüchtern, unmittelbar vor der oralen Belastung
- b) 60 Minuten nach der oralen Belastung
- c) 120 Minuten nach der oralen Belastung

Diese Blutproben blieben zunächst 30 Minuten stehen; durch Abzentrifugieren (5 Minuten bei 3000 U./Minute) wurde das Serum gewonnen. Dieses Serum wurde bei -15°C gelagert und am Versuchstag langsam bei Zimmertemperatur aufgetaut.

B. Prinzip der Insulinbestimmung

Zur Bestimmung der Insulinkonzentration im Serum wurde die Methode nach FROESCH und Mitarbeitern verwandt (1). Diesem Nachweis liegt folgendes Prinzip zugrunde: Im Nebenhodenfettgewebe der juvenilen Ratte, das sich durch einen besonders lebhaften Stoffwechsel auszeichnet, wird Glucose zu H_2O und CO_2 abgebaut. Diese Reaktion ermöglicht einen quantitativen Nachweis von Insulin, da besonders in diesem Gewebe der Ratte die Glucoseoxydation von der anwesenden Insulinmenge abhängig ist. Als Meßgröße dient der Nettogasaustausch des mit Glucose und Serum inkubierten Fettgewebes. Es besteht eine Proportionalität zwischen dem Logarithmus der Insulinkonzentration und der entwickelten Gasmenge. Einschränkend muß gesagt werden, daß auch andere Substanzen die Glucoseoxydation am Fettgewebe unspezifisch beeinflussen können (Aktivierung oder Hemmung); daher spricht man vereinbarungsgemäß im Hinblick auf die gewonnenen Meßergebnisse nicht von Insulinaktivität, sondern von insulinähnlicher Aktivität (insulin like activity = ILA). Bei diesem Verfahren wird die gesamte im untersuchten Patientenserum erhaltene ILA am Fettgewebe wirksam (sog. freie, unterdrückbare ILA bzw. gebundene, nicht unterdrückbare ILA).

Um zwischen unterdrückbarer ILA und nicht unterdrückbarer ILA zu unterscheiden, d. h. den Anteil von freiem und gebundenem Insulin zu bestimmen, wird die ILA jedes Serums auch nach Zusatz eines spezifischen Antiserums gemessen. Hierbei kommt der Anteil an freiem, durch die Antikörper unterdrückten Insulin, nicht zur Entfaltung der biologischen Aktivität. Die Differenz beider Bestimmungen entspricht dem Anteil an gebundenem Insulin.

In den unten beschriebenen Versuchen kam ein aus immunisierten Meerschweinchen gewonnenes Antiserum zur Anwendung. Der Titer des Antiserums wurde mit Lösungen von kristallinem Insulin bestimmt; die zur vollständigen Unterdrückung der freien ILA notwendige Menge bewegte sich im allgemeinen zwischen 0,06 - 0,08 ml pro Reaktionsansatz.

Als weitere Möglichkeit zur Bestimmung der freien ILA kommt auch die Bestimmung der Glucoseaufnahme des Rattenzwerchfells in Betracht. Das gebundene Insulin soll am Muskelgewebe nicht wirksam sein. Die in der Zeiteinheit aufgenommene Glucosemenge ist dem Logarithmus der vorhandenen Insulinkonzentration proportional.

C. Chemische und biochemische Untersuchungsmethoden

1. Enzymatische Glucosebestimmung

Die in der Klinik häufig verwendeten Methoden der Blutzuckerbestimmung beruhen auf der reduzierenden Eigenschaft der Zucker und sind daher mehr oder minder unspezifisch für die Glucose; denn auch andere reduzierende Stoffe, wie Fructose, Galaktose, Pentosen werden bei diesen Methoden miteingefasst. Man erhält also höhere Blutzuckerwerte, als dem wahren Glucosegehalt entspricht.

Die enzymatische Methode der Fa. BOEHRINGER & Söhne scheint der Forderung nach Spezifität und leichter Durchführung zu genügen. Die Normalwerte betragen 46 bis 94 mg% (Durchschnitt 70 mg%) und liegen im Mittel 20 bis 25 mg% unter den unspezifischen Werten der anderen Methoden.

Das Prinzip der Reaktion ist folgendes:

Das Enzym Glucoseoxydase (GOD) katalysiert die Oxydation von β -D-Glucose zum Glukonlakton, das weiter mit Wasser zu Gluconsäure reagiert:



Das dabei entstandene H_2O_2 wird in gekoppelter Indikatorreaktion weiter umgesetzt. H_2O_2 oxydiert unter enzymatischer Katalyse durch Peroxydase (POD) den Wasserstoffdonator "DH₂" (z.B. o-DIANISIDIN), der dabei in den rotbraunen Farbstoff "D" übergeht:



Die Gesamtgleichung lautet dann



Die Menge des braunen Farbstoffes D ist also ein Maß für die umgesetzte Glucosemenge. Da die Reaktionen quantitativ ablaufen und GOD spezifisch auf D-Glucose eingestellt ist, wird also nur die "wahre" Glucose gemessen. Der Farbstoff wird bei einer Wellenlänge von 436 m μ kolorimetrisch bestimmt.

Notwendige Reagentien:

1. Natriumdihydrogenphosphat NaH_2PO_4
2. Dinatriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4
3. Glucose-Oxydase

4. o-Dianisidinhydrochlorid
5. Peroxydase
6. D-Glucose, DAB 6

Diese Reagentien sind enthalten in der Biochemica TEST COMBINATION.

Herstellung der Lösungen:

1. Puffer - Enzym - Gemisch
 0,12 mol Phosphatpuffer, pH = 7,0
 40 µg Peroxydase / ml
 250 µg Glucoseoxydase / ml
 ad 150 ml aqua bidestillata
2. Chromogen
 6,6 mg o-Dianisidinhydrochlorid / ml
 ad 2,0 ml aqua bidestillata
3. Glucosestandardlösung
 91 µg Glucose / ml
4. 3,6 %ige Perchlorsäure zum Enteiweißen

Die Substanzen 1 und 2 werden im Verhältnis 100 : 1 gemischt und ergeben das Glucosereagenz.

Durchführung:

- a. Die dem zu untersuchenden Inkubationsmedium entnommene Probe von 0,1 ml wird mit 3,6 %iger Perchlorsäure enteiweißt und 5 Minuten bei 3000 U/min. zentrifugiert.
- b. Bestimmungsansatz

Reagenzienleerwerte	5,0 ml Glucosereagenz
	0,2 ml aqua bidest.
Glucosestandardwerte	5,0 ml Glucosereagenz
	0,2 ml Glucosestandardlösung
zu untersuchende Proben	5,0 ml Glucosereagenz
	0,2 ml enteiweißter Lösungsüberstand

Die Ansätze bleiben 35 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Nach dieser Zeit wird die Extinktion aller Proben, sowie die des Glucosestandardwertes, gegen die Extinktion des Reagenzienleerwertes bei einer Wellenlänge von 436 mµ in 1 cm Küvetten abgelesen.

Berechnung:

Um den Glucosegehalt pro ml Blut zu erhalten, bezieht man die Messung auf die

Extinktion der Glucosestandardlösung. Der Glucosestandardwert enthält 18,2 μg Glucose pro Reaktionsansatz, was 1 mg/ml Blut entspricht, es ist also

$$\frac{E}{\text{Standard}} = \text{mg/ml Blut}$$

oder

$$\frac{E\text{-Probe}}{E\text{-Standard}} \times 100 = \text{mg \% Glucose}$$

Spezifität und Fehlerbreite:

Dieser Test ist spezifisch auf D-Glucose. Andere Zucker (z.B. Fructose, Lactose, Galaktose, Pentosen) werden nicht erfaßt. Lediglich Mannose ergibt eine positive, aber erheblich schwächere Reaktion als Glucose; jedoch sind keine pathologischen Bedingungen bekannt, bei denen Mannose im Blut vorkommt.

Reduzierende Substanzen wie Kreatinin, Glucuronsäure und Harnsäure stören nicht. Dagegen können hohe Glutathionkonzentrationen und extrem hohe Dosen Vitamin C zu niedere Werte vertauschen. Die durchschnittliche Fehlerbreite dieser Methode liegt unter $\pm 5\%$.

2. Fettgewebsmethode zur Insulinbestimmung

Als Versuchstiere dienten 150 - 180 g schwere männliche Sprague-Dawley-Ratten von möglichst gleichem Alter, die mit Altronin-Spezialkost und Wasser ad libidum ernährt wurden. Für die Versuchsanordnung wurden jeweils sechs Ratten gebraucht, die zwölf Stunden vor Versuchsbeginn auf Hunger gesetzt wurden.

Die Tiere wurden durch einen Schlag auf den Kopf getötet, dekapitiert und entblutet. Das Abdomen wurde breit geöffnet, um guten Zugang zum epididymalen Fettgewebe zu haben. Die beiden der Epididymis aufsitzenden Fettgewebszipfel wurden entlang des Hauptgefäßes mit einem Schnitt abgetrennt und der Nebenhoden dabei auf keinen Fall verletzt. Die Gewebstücke wurden nun von immer dem gleichen distalen Ende her in sechs möglichst gleichgroße Stücke geteilt und wie folgt in die bereitstehenden zwölf Inkubationsgefäße verteilt: In jedes Gefäß kamen sechs Stücke, die von jeweils sechs verschiedenen Tieren stammten. Die Verteilung der Gewebstücke wurde so vorgenommen, daß die in einem Trog enthaltenen sechs Sechstel sich aus sechs verschiedenen Abschnitten von sechs verschiedenen epididymalen Fettanhängen zusammensetzten. Dadurch wurde ein gutes biologisches Mittel erreicht über die verwendeten Ratten und über die distalen und proximalen Anteile der Fettgewebszipfel, die eventuell eine unterschiedliche Stoffwechselaktivität besitzen. Außerdem soll nach

HUMBEL (2) die Insulinempfindlichkeit bei mehreren kleinen Stücken größer sein als bei wenigen, dafür aber entsprechend größeren Stücken. Offentar spielen sich die Stoffwechselvorgänge des in vitro inkubierten Fettgewebstückes vor allem an seiner Oberfläche ab. Die Präparation der Gewebe erfolgte unter größtmöglicher Schonung. Da man den rechten und den linken epididymalen Fettanhang im Hinblick auf seine biologische Aktivität gleichsetzt, konnten somit zwölf Einzelversuche durchgeführt werden. Zur Bestimmung des Gewichtes wurden die Inkubationsgefäße vor und nach der Zugabe der Fettzipfel auf 0,0001 g genau gewogen. Die Gewichts Differenz ergab die Fetteinwaage; es wurde versucht, eine durchschnittliche Einwaage von 150 mg nicht wesentlich zu unter- oder überschreiten. Als Inkubationslösung diente Krebs-Ringer-Puffer, der an einem elektrischen pH-Meter auf einen Wert von 7,3 eingestellt wurde.

Zusammensetzung der Krebs-Ringer-Lösung:

NaCl	8,26 g =	141,000 mMol	Endkonz.
CaCl ₂ · 2H ₂ O	335,90 mg =	2,284 mMol	"
KCl	422,00 " =	5,660 mMol	"
MgSO ₄ · 7H ₂ O	350,00 " =	1,420 mMol	"
KH ₂ PO ₄	193,50 " =	1,420 mMol	"

ad 1000 ml aqua bidest.

Natriumbicarbonatlösung:

NaHCO ₃	2,875 g =	34,200 mMol	"
--------------------	-----------	-------------	---

Herstellung des Puffers:

54,5 ml Krebs-Ringer-Lösung und 9,5 ml Natriumbicarbonat-Lösung, die vorher 5 Min. lang mit reinem CO₂ begast wurde, werden zusammengegeben. Diese Lösung wurde nun 10 Min. lang mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) begast und auf den geforderten pH gebracht; bei zu saurer Reaktion wurde überschüssiges CO₂ durch Schütteln ausgetrieben. Zu diesem Inkubationsmedium wurden 200 mg d-Glucose zugesetzt. Die Pufferlösung wurde für jeden Versuch aus Stammlösungen frisch zubereitet.

Inkubationsansatz:

In jedes Reaktionsgefäß wurden 1,6 ml Puffer und 0,4 ml des zu untersuchenden Serums, das bei -16° C gelagert war, pipettiert. Die Serumverdünnung beträgt somit 1 : 5, wie sie von verschiedenen Autoren als optimal erklärt wurde. Das zur Bestimmung des sog. "gebundenen" Insulins nötige Antiinsulinserum in der Menge von 0,06 - 0,08 ml wurde in den entsprechenden Ansätzen zu den 2 ml Inkubationsmedium dazupipettiert und bei der späteren Berechnung als Volumen-

menge vernachlässigt. Um eine Veränderung des eingestellten pH durch Luftzutritt zu verhindern, wurden die Reaktionsgefäße mit Gummistopfen verschlossen und nur die kurze Zeit, die zum Einlegen der Fettgewebstücke nötig ist, geöffnet. Als Reaktionsgefäße wurden geeichte Warburgtröge mit Seitenarm und Kamin verwendet, mit einem durchschnittlichen Volumen von 15 ml. Zur Gasvolumenbestimmung wurden U-Manometer der Fa. GILSON-ELEKTRONIKA und Doppelkapillarmanometer der Fa. BRAUN verwandt.

Die fertigen Tröge wurden nach Anschluß an die Manometer 2 Minuten über den Kamin mit Carbogen begast, darauf die Brodielösung in den Kapillarschenkeln auf die Fixpunkte eingestellt und die Hähne geschlossen. Die Inkubationsdauer betrug 150 Minuten bei einer Temperatur von 37,5° C und einer Schüttelfrequenz von 96/Minute. Die Druckdifferenz zwischen den beiden Manometerschenkeln wurde alle 15 Minuten abgelesen und neu auf den Fixpunkt eingestellt, um die Reaktion bei dem geforderten konstanten Volumen des Reaktionssystems ablaufen zu lassen.

Eichung der Methode:

Zur Eichung der biologischen Aktivität des für eine Versuchsreihe verwendeten Fettgewebspools sind Standardinsulinwerte mit eingewogenem Rinderinsulin nötig. Es wurden jeweils vier Standardansätze als Doppelbestimmung von 100 bzw. 1000 µE/ml kristallinem Insulin als Bezugsgröße durchgeführt.

Herstellung der Insulinlösung:

9,1 mg Rinderinsulin (zehnmals umkristallisiert, glucagonfrei, 0,39 % Zinkgehalt) werden in 10 ml n/10 HCl gelöst. 1 ml dieser Lösung enthält 20 IE Insulin. Diese Standardlösung wird bei 0 - 2° C aufbewahrt und ist mehrere Wochen haltbar.

Durch weitere Verdünnung mit fertiger Pufferlösung wurden die gegebenen Insulinkonzentrationen für die Standardvergleichswerte an jedem Versuchstag neu hergestellt.

Berechnung:

Grundlage der manometrischen Meßmethode ist die genaue Ermittlung des Systemvolumens, das Ausgangsgröße für die zur Auswertung der manometrischen Ablesung unerläßliche Bestimmung der Gefäßkonstanten ist. Nach Maßangabe des Volumens vom leeren Reaktionsgefäß und dem Volumen der Kapillaren des angeschlossenen Manometers bis zu der festgelegten Marke (15,0 bzw. 20,0 je nach Manometer), ergibt sich die Gefäßkonstante für jedes der zu benutzenden Reaktionssysteme aus folgender Formel:

$$\frac{V_G \cdot \frac{273}{T} + V_F \cdot \alpha}{P_O} = K$$

- V_G = Volumen des Gasraumes im Versuchsgefäß einschließlich Manometerkapillare
 $(V_{\text{Warburgtrog}} + V_{\text{Manometer}} + 0,10 - V_F)$
 T = absolute Versuchstemperatur (310,5 Kelvin)
 V_F = Volumen des eingefüllten Inkubationsmediums (2ml)
 α = Bunsen'scher Absorptionskoeffizient des entstehenden Gases
 (bei $\text{CO}_2 = 0,665$ bei 37°C)
 P_O = 760 mm Hg umgerechnet auf Manometerflüssigkeit
 (bei Brodie-Lösung $P_O = 10$)

Ist die Gefäßkonstante für die einzelnen Reaktionsgefäße errechnet worden, so ergibt sich die Menge des von 1 mg Gewebe pro Stunde entwickelten Gases x aus folgender Formel:

$$x = \frac{h \cdot K}{\text{Gewicht} \cdot \text{Stunden}}$$

h = Höhenunterschied der beiden Manometerschenkel bei Versuchsende in mm.

3. Diaphragmamethode

Es wird der gleiche Inkubationspuffer aus Krebs-Ringer- und Natriumbicarbonatlösung verwendet wie bei der Fettgewebsmethode, nur mit dem Unterschied, daß statt 200 mg% Glucose 300 mg% eingewogen wurden. Die auf die gleiche Weise vorbereiteten Sprague-Dawley-Ratten wurden durch einen Schlag auf den Kopf getötet, dekapitiert und entblutet. Durch zwei schräge Mediollateral-Schnitte wurde das Abdomen vom Unterbauch aus bis zu den Rippenbögen breit geöffnet, und von der Bauchhöhle her das Zwerchfell herauspräpariert. Um besseren Zugang zum Diaphragma zu gewinnen, wurde die Leber entfernt. Entlang der sehnigen Verbindung zwischen Muskel und Brustwand wurde das Diaphragma durchtrennt, herausgehoben und anhaftendes Blut entfernt. Nach Abtrennen des Centrum tendineum wurde die Muskelplatte halbiert, die so dargestellten Semidiaphragmen in glucosefreie Inkubationslösung gebracht und 15 Minuten eisgekühlt. Sie werden dann sorgfältig mit Filterpapier abgetrocknet und in die Inkubations-tröge gebracht, die für diese Methode keinen Seitenarm und Kamin nötig haben. Das Inkubationsmedium setzt sich wieder aus 1,6 ml Pufferlösung und 0,4 ml Serum zusammen. Die Glucosekonzentration eines jeden Inkubationsansatzes wird vor und nach der Inkubation mit dem Diaphragma auf enzymatischem Weg bestimmt. Die Inkubationsdauer im Warburggerät betrug 150 Minuten bei $37,5^\circ \text{C}$ und einer Schüttelfrequenz von 96/Minute. Die Diaphragmen wurden nach beendeter Inkubation herausgenommen, auf Filterpapier abgetupft und auf vorge-

wogenen Uhrgläschen bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, danach auf der Analysenwaage mit einer Genauigkeit von 0,01 mg gewogen. Die Glucoseaufnahme wird in mg Glucose/mg Zwerchfell ausgedrückt.

Die Eichung des Verfahrens erfolgte wie bei der Fettgewebismethode unter Verwendung von Standardinsulinlösungen mit bekannter Konzentration (50 und 500 μ E/ml mit Doppelbestimmung).

III. Ergebnisse

Die Ergebnisse werden im folgenden in Form von Tabellen und Abbildungen wiedergegeben.

Tabelle 1: Werte der Blutglucose (in mg%) und des Seruminsulins (in μ E/ml) der Gruppe 1

1				
T. M., 22 J.	Zeit	0'	60'	120'
	mg% Gluc.	38	83	88
	Fr. I. F. ⁺	22	96	55
	Geb. I.	163	306	239
	Ges. I.	185	402	294
	Fr. I. D.	128	106	94

2				
T. M., 33 J.	mg% Gluc.	51	112	116
	Fr. I. F.	33	71	46
	Geb. I.	35	204	166
	Ges. I.	68	275	212
	Fr. I. D.	640	307	19

3				
T. G., 22 J.	mg% Gluc.	60	85	37
	Fr. I. F.	47	48	30
	Geb. I.	71	136	143
	Ges. I.	118	184	173
	Fr. I. D.	140	7	26

4				
R. B., 17 J.	mg% Gluc.	43	70	68
	Fr. I. F.	41	65	38
	Geb. I.	91	144	171
	Ges. I.	132	209	209
	Fr. I. F.	0	75	122

- ⁺ Fr. I. F. = freies Insulin bestimmt am Fettgewebe
 Geb. I. = gebundenes Insulin bestimmt am Fettgewebe
 Ges. I. = Gesamtinsulin
 Fr. I. D. = freies Insulin bestimmt am Diaphragma

	Zeit	0'	60'	120'
5				
B.R., 28 J.	mg% Gluc.	38	121	120
	Fr. I. F.	21	79	65
	Geb. I.	367	450	205
	Ges. I.	388	529	270
	Fr. I. D.	220	340	750
6				
B.I., 19 J.	mg% Gluc.	47	88	80
	Fr. I. F.	28	61	22
	Geb. I.	169	159	181
	Ges. I.	197	220	203
	Fr. I. D.	36	55	62
7				
F.M., 21 J.	mg% Gluc.	70	108	107
	Fr. I. F.	18	40	29
	Geb. I.	94	96	96
	Ges. I.	112	136	125
	Fr. I. D.	37	46	92
8				
M.I., 27 J.	mg% Gluc.	35	82	91
	Fr. I. F.	30	39	31
	Geb. I.	105	152	105
	Ges. I.	135	191	136
	Fr. I. D.	460	500	98
9				
H.T., 25 J.	mg% Gluc.	41	96	69
	Fr. I. F.	28	50	56
	Geb. I.	58	63	54
	Ges. I.	86	113	110
	Fr. I. D.	156	135	110

	Zeit	0'	60'	120'
10				
D.R., 32 J.	mg% Gluc.	39	89	94
	Fr. I. F.	39	120	46
	Geb. I.	135	175	139
	Ges. I.	174	295	185
	Fr. I. D.	255	275	140
11				
A. I., 23 J.	mg% Gluc.	51	78	89
	Fr. I. F.	19	48	40
	Geb. I.	147	151	140
	Ges. I.	166	199	180
	Fr. I. D.	32	69	69
12				
W. Th., 27 J.	mg% Gluc.	49	123	130
	Fr. I. F.	40	58	30
	Geb. I.	147	164	175
	Ges. I.	187	222	205
	Fr. I. D.	128	182	136
13				
P. G., 19 J.	mg% Gluc.	38	130	85
	Fr. I. F.	34	57	32
	Geb. I.	154	177	150
	Ges. I.	188	234	182
	Fr. I. D.	28	0	345
14				
K. A., 25 J.	mg% Gluc.	48	86	79
	Fr. I. F.	30	59	30
	Geb. I.	176	203	168
	Ges. I.	206	262	198
	Fr. I. D.	8	25	21

	Zeit	0'	60'	120'
15				
H.E., 29 J.	mg% Gluc.	77	130	92
	Fr. I. F.	-11	0	-24
	Geb. I.	196	244	203
	Ges. I.	185	244	179
	Fr. I. D.	132	375	140

16				
H.H., 31 J.	mg% Gluc.	64	122	63
	Fr. I. F.	-21	-10	-28
	Geb. I.	299	146	161
	Ges. I.	278	136	133
	Fr. I. D.	161	168	149

Tabelle 2: Werte der Blutglucose (in mg%) und des Seruminsulins (in μ E/ml) der Gruppe 2

	Zeit	0'	60'	120'
1				
G.H., 29 J.,	mg% Gluc.	58	146	104
positive Diabetes-	Fr. I. F.	42	70	107
Familienanamne-	Geb. I.	275	345	273
se	Ges. I.	317	415	380
	Fr. I. D.	41	24	31

2				
S.E., 28 J.,	mg% Gluc.	50	120	129
positive Diabetes-	Fr. I. F.	27	48	79
Familienanam-	Geb. I.	209	251	210
nese	Ges. I.	236	299	289
	Fr. I. D.	0	21	186

	Zeit	0'	60'	120'
3				
N. T., 31 J.,	mg% Gluc.	43	121	109
Geburt überge-	Fr. I. F.	79	82	95
wichtiger Kin-	Geb. I.	70	106	95
der (4100 g)	Ges. I.	149	188	190
	Fr. I. D.	20	31	37
4				
G. H., 23 J.,	mg% Gluc.	40	41	52
positive Diabe-	Fr. I. F.	72	110	119
tes-Familien-	Geb. I.	216	255	231
anamnese	Ges. I.	288	365	350
	Fr. I. D.	142	200	128
5				
St. E., 23 J.,	mg% Gluc.	61	119	100
Geburt überge-	Fr. I. F.	30	52	81
wichtiger Kin-	Geb. I.	189	216	179
der (4300 g,	Ges. I.	219	268	260
4450 g)	Fr. I. D.	80	109	620
6				
L. U., 25 J.,	mg% Gluc.	36	97	98
Geburt eines	Fr. I. F.	32	77	107
übergewichti-	Geb. I.	101	139	164
gen Kindes	Ges. I.	133	216	271
(4450 g)	Fr. I. D.	34	500	295
7				
P. Th., 36 J.,	mg% Gluc.	50	149	128
Geburt eines	Fr. I. F.	24	66	105
übergewichti-	Geb. I.	193	208	88
gen Kindes	Ges. I.	217	274	193
(4240 g)	Fr. I. D.	142	222	130

	Zeit	0'	60'	120'
8				
G. H., 22 J.	mg% Gluc.	39	100	59
positive Diabete-	Fr. I. F.	41	42	112
tes-Familien-	Geb. I.	71	106	54
anamnese	Ges. I.	112	148	166
	Fr. I. D.	0	34	10

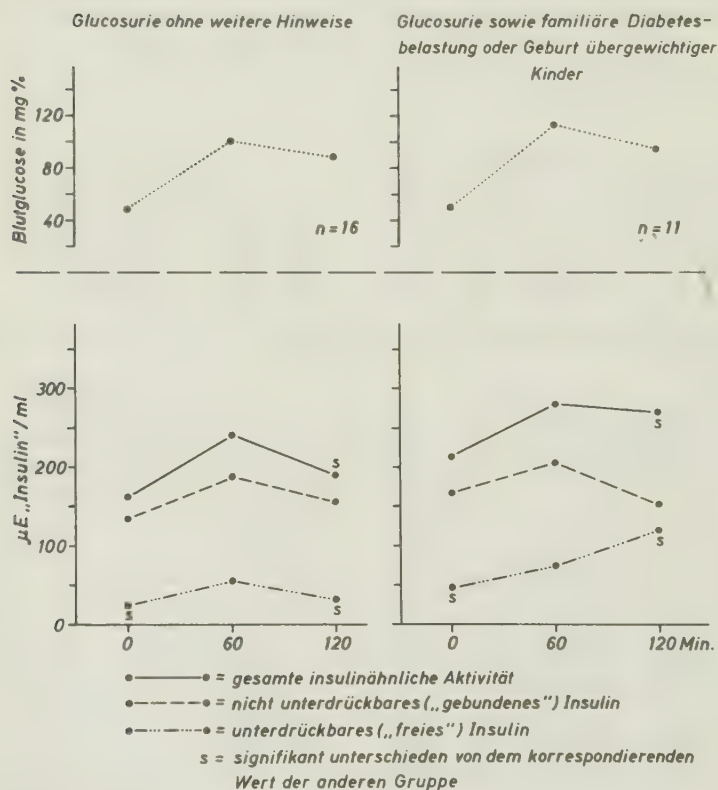
9				
M. H., 30 J.,	mg% Gluc.	81	93	75
positive Diabete-	Fr. I. F.	38	61	135
tes-Familien-	Geb. I.	285	381	286
anamnese	Ges. I.	323	442	421
	Fr. I. D.	699	762	765

10				
St. R., 33 J.	mg% Gluc.	43	146	105
positive Diabetes-	Fr. I. F.	62	110	162
Familienanam-	Geb. I.	126	127	69
nese	Ges. I.	188	237	231
	Fr. I. D.	38	0	60

11				
M. Th., 35 J.,	mg% Gluc.	53	106	82
Geburt überge-	Fr. I. F.	53	75	191
wichtiger Kin-	Geb. I.	106	137	27
der (4250 g,	Ges. I.	159	212	218
4000 g)	Fr. I. D.	66	210	137

Abb. 1

Verhalten der Seruminsulinwerte nach Glucosebelastung (100g per os) bei glucosurischen Schwangeren mit normaler Glucosetoleranz.
Bestimmung der insulinähnlichen Aktivität am Fettgewebe.



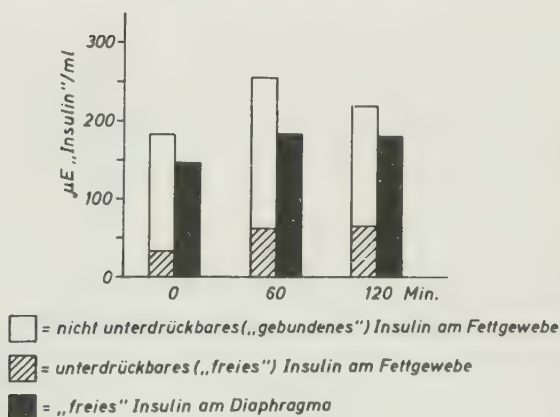
Mittelwerte der Abb. 1

Gruppe 1	Zeit	0'	60'	120'
	mg% Gluc.	48	100	88
	Fr. I. F.	24	54	34
	Geb. I.	137	186	155
	Ges. I.	163	240	189

Gruppe 2	Zeit	0'	60'	120'
	mg% Gluc.	50	113	94
	Fr. I. F.	46	73	118
	Geb. I.	167	206	152
	Ges. I.	213	279	270

Verhalten der Seruminsulinwerte nach Glucosebelastung(100g per os)
bei 27 Schwangeren.

Bestimmung des „Insulins“ am Fettgewebe und am Diaphragma.



Mittelwerte der Abb. 2

Gruppe 1 und

Gruppe 2

Zeit	0'	60'	120'
mg% Gluc.	49	105	91
Fr. I. F.	33	62	66
Geb. I.	150	194	154
Ges. I.	183	256	222
Fr. I. D.	143	184	182

Signifikanzberechnung der Unterschiede zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2:

Zeit	0'	60'	120'
Freies Insulin	$p < 0,001$	$(p > 0,05)$	$p < 0,001$
Geb. Insulin	$(p > 0,05)$	$(p > 0,05)$	$(p > 0,05)$
Gesamt Insulin	$(p > 0,05)$	$(p > 0,05)$	$p < 0,01$

Signifikanzberechnung innerhalb der einzelnen Gruppen:

Freies Insulin

Gruppe 1	Wert bei	0'	gegen	Wert bei	60'	$p < 0,001$
	" "	0'	" "	" "	120'	$(p > 0,05)$
	" "	60'	" "	" "	120'	$p < 0,001$
Gruppe 2	" "	0'	" "	" "	60'	$p < 0,001$
	" "	60'	" "	" "	120'	$p < 0,001$
	" "	60'	" "	" "	120'	$p < 0,005$

Gebundenes Insulin

Gruppe 1	Wert bei	0'	gegen	Wert bei	60'	$p < 0,005$
	" "	0'	" "	" "	120'	$(p > 0,05)$
	" "	60'	" "	" "	120'	$(p > 0,05)$
Gruppe 2	" "	0'	" "	" "	60'	$(p > 0,05)$
	" "	0'	" "	" "	120'	$(p > 0,05)$
	" "	60'	" "	" "	120'	$(p > 0,05)$

Gesamt ILA

Gruppe 1	Wert bei	0'	gegen	Wert bei	60'	$p < 0,001$
	" "	0'	" "	" "	120'	$(p > 0,05)$
	" "	60'	" "	" "	120'	$p < 0,01$
Gruppe 2	" "	0'	" "	" "	60'	$p < 0,001$
	" "	0'	" "	" "	120'	$p < 0,001$
	" "	60'	" "	" "	120'	$(p > 0,05)$

(p 0,05 = mathematisch keine Differenz vorhanden)

IV. Diskussion

1. Besprechung des vorliegenden Schrifttums

Ein direkter quantitativer Nachweis kleinster Insulinmengen auf chemischem oder physiko-chemischem Weg, der zur Bestimmung physiologisch kleinster Mengen in Körperflüssigkeiten dienen könnte, ist bis heute nicht bekannt. Der Nachweis ist aus verschiedenen Gründen mit Schwierigkeiten verbunden. Es ist sowohl die im Serum vorhandene Menge für eine chemische Nachweismethode als auch die Unterscheidbarkeit zu den wesentlich höher konzentrierten Serumproteinen zu gering. Das Prinzip der heute verwandten Methoden zur quantitativen Bestimmung von Insulin im Serum beruht auf dem Vergleich bestimmter biologischer Wirkungen von Serum oder Plasma mit den entsprechenden Wirkungen kristallinen Insulins.

Methodik der Insulinbestimmung in vivo:

Mit dem ersten biologischen Verfahren, das zur Anwendung gelangte, wird der hypoglykämische Effekt am lebenden Versuchstier gemessen. Die Wirkung auf den Blutzuckerspiegel der Versuchsobjekte ist jedoch hierbei in seiner Empfindlichkeit so gering, daß man nur schwer das im Serum vorhandene Insulin nachweisen kann.

Die blutzuckersenkende Wirkung am hungernden Kaninchen, die in der pharmazeutischen Industrie zur Standardisierung von Insulinlösungen verwandt werden, erfuhr eine Verbesserung durch die Empfindlichkeitssteigerung der Versuchstiere, wie sie durch Hypophys-Adrenektomie erzielt wurde (3, 4). Neuerdings wurde diese Methode noch verbessert, aber sie ist immer noch zu unempfindlich und wegen der operativen Vorbereitung der Tiere zu aufwendig.

Die Bestimmungsmethoden, die auf Stoffwechseluntersuchungen isolierter Gewebe in vitro beruhen, sind einfacher durchzuführen.

Methodiken der Insulinbestimmung in vitro:

a) Besonders leicht läßt sich die Insulinwirkung durch Glucoseaufnahme am isolierten Rattenzwerchfell messen. Diese Methode wurde 1952 von GROEN (5) zum erstenmal durchgeführt und später von zahlreichen Autoren beschrieben (6, 7, 8, 9, 10). Insulin bewirkt eine Steigerung der Glucoseaufnahme über den Basalwert. Die auf diese Weise gemessene insulinähnliche Aktivität ist durch Antikörper voll hemmbar. Die Fehlerbreite bei dieser Methode wird in der Literatur übereinstimmend mit 30 % bis 300 % des gefundenen Wertes angegeben (7, 9). VALLANCE-OWEN (8) verfeinerte die Diaphragmamethode von GROEN und bestätigte seine Befunde, daß bis zu einer unteren Grenze von

5 $\mu\text{E}/\text{ml}$ eine deutliche quantitative Beziehung zwischen Insulinmenge und Glucoseaufnahme ins Diaphragma besteht. Bei Normalpersonen fand er Werte zwischen 62,5 und 652 $\mu\text{E}/\text{ml}$. Die Inkubationszeit betrug allerdings nur 90 Minuten im Gegensatz zu unseren 120 Minuten. Auch VALLANCE-OWEN fand eine direkte Beziehung zwischen Blutzuckerniveau und Höhe des Insulinspiegels. Auch quergestreifte Muskulatur aus anderen Körperregionen zeigt ein allerdings schwächeres Ansprechen auf Zusatz von Insulin.

b) Das leicht zugängliche epididymale Fettgewebe der Ratte erwies sich als sehr geeignet für Untersuchungen des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels in vitro. Das Fettgewebe besitzt, wie wir aus Arbeiten von HAUSBERGER (11, 12), MILSTEIN (13) und RENOLD (14) wissen, einen sehr lebhaften intermediären Stoffwechsel. Bei Versuchen mit markierten Substanzen fand man im Fettgewebe eine etwa zehnmal höhere Fettsäuresynthese aus Glucose als in der Leber (15, 16). Diese Stoffwechselvorgänge werden von Insulin aktiviert. Seine direkte Wirkung auf den Stoffwechsel im Fettgewebe beweisen Störungen, die bei alloxandiabetischen Tieren auftreten und die durch Insulin vollkommen beseitigt werden können (11, 12, 17).

Als Maß für die Insulinwirkung kann die Oxydation von Glucose zu CO_2 , die Synthese von Fettsäuren und Glykogen und auch die Glucoseaufnahme verwertet werden. Am häufigsten wird die Glucoseoxydation unter Verwendung von Glucose-1- C^{14} zu C^{14}O_2 gemessen (1, 18, 19, 20, 21, 22). So bestimmten MARTIN, DAGENAIIS und RENOLD (23) als erste kleinste Insulinmengen, an deren Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel des isolierten Fettgewebes der Ratte unter Verwendung radioaktiv markierter Glucose. Diese Methode baut auf Arbeiten von MILLSTEIN (19), WINEGRAD und RENOLD (24) auf. Für die quantitative Insulinbestimmung mit dem epididymalen Fettgewebe der Ratte und radioaktiver Glucose erwies sich die Markierung des Traubenzuckers am 1. Kohlenstoffatom als besonders vorteilhaft, wenn der Insulineffekt an der C^{14}O_2 -Bildung gemessen werden soll. Mit unterschiedlich markierten Glucosemolekülen wurde nach Insulinzusatz ein besonders markanter Anstieg der Oxydation am C-1-Atom gefunden. C-6 wurde dagegen im Gewebe vorwiegend zur Fettsynthese benutzt. Da C-6 und auch C-1 im gleichen Maße über den glykolytischen Abbauweg nach EMBDEN-MEYERHOF in Fettsäuren eingebaut werden, spricht dieser Befund für eine selektive Insulinwirkung auf die direkte Oxydation, z. B. über den Dickens-Horecker-Zyklus, eine Ansicht, die zuerst MILLSTEIN (19) geäußert hat. Auf die Glykolyse übt Insulin wahrscheinlich keinen wesentlichen Einfluß aus. Auch die von ABRAHAM und Mitarb. (25) erhobenen Befunde an Schnitten der laktierenden Brustdrüse der Ratte unterstützen diese Annahme. Nach DITSCHUNEIT und PFEIFFER (20) besteht sowohl eine exponentielle Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus der Insulinkonzentration und der Quadratwurzel aus der gemessenen und auf mg Fettge-

wicht umgerechneten Impulszahl pro Minute, die eine lineare Regression ergibt und bei entsprechender Koordinateneinteilung graphisch als Gerade erscheint. Aber die Abstände der einzelnen Kurven von der Abszisse sind signifikant voneinander verschieden, und daher muß die Standardkurve für jeden Versuch mit dem Fettgewebe der gleichen Tiere, mit dem auch die unbekannten Seren getestet werden, neu bestimmt werden. Da der Anstieg dieser Kurven konstant bleibt und die Kurven parallel zueinander verlaufen, genügt theoretisch die Bestimmung von einer Insulinkonzentration, um die Eichkurve für jeden Versuch neu festzulegen.

Ein weiterer Parameter zur Messung der ILA am Fettgewebe *in vitro* ist die Glucoseaufnahme oder aber die Nettogasaustauschmethode, wie sie von BALL und MERRILL zuerst durchgeführt wurde (26) und auch unserer Arbeit zugrunde liegt. FROESCH (1) führte nebeneinander die Nettogasaustauschmethode und die Bestimmung der ILA durch Glucoseaufnahme durch, um festzustellen, inwieweit die Insulinwirkung von Serum auf das Fettgewebe tatsächlich ILA ist und nicht andere stoffwechselaktive Hormone zur Wirkung kommen, die die Glucoseaufnahme ins Gewebe ebenfalls fördern (27, 28, 29). FROESCH fand bei einem völlig gemischten Patientengut ein Mittel aus 104 Seren und zwar bei der Bestimmung durch Glucoseaufnahme $200 \mu\text{E}/\text{ml}$ und bei der Methode mit dem Nettogasaustausch $195 \mu\text{E}/\text{ml}$ als Mittelwert. Somit wären nach FROESCH die beiden Methoden in ihrer Spezifität nahezu gleichwertig. Dagegen berichteten BALL und MERRILL von einer größeren Spezifität ihrer C^{14} -Methode als es bei der Bestimmung auf Grund der Glucoseaufnahme möglich sei, da hierbei Substanzen wie das Wachstumshormon, Adrenalin und Glucagon den Vorgang stimulierten ohne anfängliche Fettsynthese. Sie legen ihre untere Bestimmungsgrenze bei $10 \mu\text{E}/\text{ml}$, die maximale Reaktionslage bei $1000 \mu\text{E}/\text{ml}$ und setzen so die Spezifität ihrer Methode gleich der C^{14} -Methode von RENOLD. BALL und MERRILL arbeiteten mit einer Serumverdünnung von 1 : 15; das ist der höchste Verdünnungsgrad, der in der Literatur zu finden ist. Sie stellten jedoch, im Gegensatz zu fast allen anderen Autoren, keine relative Aktivitätssteigerung durch Serumverdünnungen fest. FROESCH, der mit einer Verdünnung von 1 : 5 arbeitete, versuchte die Ursache des Phänomens damit zu erklären, daß eventuell vorhandene insulinhemmende Faktoren durch die Verdünnung eine schnellere Wirkungsminderung als das im Serum befindliche Insulin erfahren.

c) Die von YALOW und BERSON (30) entwickelte Radioimmuno-Methode gilt als eine der genauesten. Die Autoren selbst geben eine Genauigkeit der Messungen bis zu $1 \mu\text{E}/\text{ml}$ an. Die Grundlage des Immunoassays ist die Fähigkeit des menschlichen Serums mit insulinbindenden Antikörpern (aus Meerschweinchen-Anti-Rinderserum) einen löslichen Komplex zu bilden und auf diese Weise durch kompetitive Hemmung die Reaktion der Antikörper mit kristallinem Rinder-Insulin- J^{131} zu verhindern. Menschliches Antiinsulinserum würde zu schwach mit menschlichem Insulin reagieren. Die Trennung von J^{131} -Insulin

und seinem Antikörperkomplex erfolgt dann etwa durch Papierelektrophorese oder mittels Ionenaustauscher. Die mit dieser Methode erhaltenen ILA-Werte sind allerdings ebenfalls keine absoluten Insulinkonzentrationen, da man nicht weiß, ob menschliches Insulin mit diesen Antikörpern in gleicher Weise reagiert wie das Rinderinsulin, das als Standardwert nebenherläuft.

Die Resultate der verschiedenen hier aufgezeigten Methoden sind nur schwer untereinander vergleichbar, da bei diesen biologischen Bestimmungen viele Wirkungsfaktoren mit hereinspielen, die nicht einheitlich auszuschalten sind. Auch innerhalb derselben Methode ist die Fehlerbreite so groß, daß eine Aussage im allgemeinen nur auf Grund von Durchschnittswerten für ein Patientenkollektiv und nicht von Einzelmessungen gemacht werden kann.

Im folgenden wird eine kurze Zusammenstellung der unterschiedlichen Ergebnisse bei den einzelnen Methoden gegeben. Unter a) werden die Nüchternwerte und unter b) die Werte nach Glucosebelastung aufgeführt.

1. Diaphragmamethode:

a) 40 - 80 $\mu\text{E/ml}$	bei VALLANCE-OWEN (31)
4600 $\mu\text{E/ml}$	bei WILLEBRANDS (7)
b) 130 - 800 $\mu\text{E/ml}$	bei VALLANCE-OWEN (31)
9000 - 22000 $\mu\text{E/ml}$	bei RANDLE (9)

2. Glucoseoxydation von 1-C^{14} zu $\text{C}^{14}/_2$ am epididymalen Fettgewebe:

a) 50 - 350 $\mu\text{E/ml}$	bei MARTIN, RENOLD und DAGENAIS (23)
135 - 680 $\mu\text{E/ml}$	bei PFEIFFER, PFEIFFER, DITSCHUNEIT und AHN (32)
b) 200 - 4000 $\mu\text{E/ml}$	bei PFEIFFER, PFEIFFER, DITSCHUNEIT und AHN (32)

3. Radio-immuno Methode:

a) 21 $\mu\text{E/ml}$	bei YALOW and BERSON (30)
b) 139 $\mu\text{E/ml}$	bei YALOW and BERSON (30).

2. Diskussion der eigenen Ergebnisse

Bei Berücksichtigung der mit der Diaphragmamethode bestimmten Werte zeichnen sich zwei Gesetzmäßigkeiten ab: Einerseits liegen die gefundenen Durchschnittswerte vor und nach Glucosebelastung zwischen der am Fettgewebe bestimmten ILA (Gesamt-ILA) und den Werten des mit Antiserum unterdrückbaren sog. freien Insulins. Zum anderen verhalten sich die Diaphragmawerte (s. Abb. 1) so, wie man es auf Grund der bisherigen Kenntnisse über die Dynamik der Insulinsekretion und auch angesichts des Verlaufes der Glucosebelastungskurve erwarten sollte. Aus diesen beiden Befunden kann geschlossen werden, daß das sog. freie, am Diaphragma bestimmte Insulin nicht identisch ist mit dem am Fettgewebe bestimmten, mit Antiserum unterdrückbaren freien Insulin, und daß innerhalb der am Diaphragma ermittelten Aktivität Insulin in irgend einer Form erfaßt wird. Leider täuschen die akzeptablen und sich gut in unsere bisherigen Vorstellungen einfügenden Mittelwerte der Diaphragmamethode über die Ungenauigkeit des Verfahrens hinweg. Die Streuung der Einzelwerte ist nämlich derartig groß, daß - wie auch andere Autoren gezeigt haben - der Wert der Methode stark eingeschränkt ist. Wie ENNEMOSER (33) kommen wir zu dem Schluß, daß der Diaphragmamethode für Einzelbestimmungen praktisch keine und für die Untersuchung von Kollektiven nicht mehr als ein orientierender Wert zukommt. Für die Besprechung des Verhaltens der Insulinaktivität verschiedener Patientengruppen werden deswegen im folgenden nur die Werte des mit dem epididymalen Fettgewebe der Ratte bestimmten Insulins herangezogen.

Unsere beiden Patientenkollektive unterscheiden sich, wie eingangs beschrieben, dadurch, daß eine Gruppe von glucosurischen Schwangeren mit einer Diabetes-Familienanamnese oder mit der Geburt übergewichtiger Kinder in der eigenen Anamnese gegenübergestellt wurde einer Vergleichsgruppe von Schwangeren, die lediglich eine Glucosurie, jedoch keine anderen in Richtung auf einen Diabetes verdächtigen Symptome aufwiesen. Mit gleicher Methodik hatte ENNEMOSER Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Ergebnisse von Wöchnerinnen nach der Geburt eines normalgewichtigen Kindes (durchschnittliches Geburtsgewicht 3300 g) mit den Ergebnissen von Wöchnerinnen nach der Geburt eines schweren Kindes (durchschnittliches Geburtsgewicht 4300 g) verglichen wurden. Die Frauen aller Versuchsgruppen - bei ENNEMOSER wie auch bei uns - hatten eine normale Glucosetoleranzkurve; jedoch bestand sowohl bei den ENNEMOSER'schen wie bei den eigenen Experimenten eine Gruppe, bei der der Verdacht auf einen Prädiabetes näher lag als bei der Vergleichsgruppe. In dieser Hinsicht kann man folgende Abstufungen treffen in Richtung auf einen zunehmenden Verdacht für das Vorliegen eines Prädiabetes:

1. Gruppe 1 von ENNEMOSER, d. h. Wöchnerinnen mit normalgewichtigen Neugeborenen

2. Gruppe 2 unserer Untersuchungen, d. h. Schwangere mit einer Glucosurie und Hinweise im Sinne eines potentiellen Diabetes
3. Gruppe 2 von ENNEMOSER, d. h. Wöchnerinnen mit übergewichtigen Neugeborenen.

An Hand der Insulinwerte läßt sich dieser Trend, wie gleich zu zeigen sein wird, auch tatsächlich bestätigen. Wie fügt sich nun in diese Reihe unsere Gruppe 1 ein, d. h. jene Schwangeren, die lediglich eine Glucosurie aufweisen? Erwartungsgemäß geben die Werte des Seruminsulins, daß sozusagen der Schweregrad des Prädiabetes dieser Frauen zwischen der Gruppe 1 von ENNEMOSER und der Gruppe 2 unserer Untersuchungen zu suchen ist. Daraus kann man entweder schließen, daß die sog. harmlose Schwangerschaftsglucosurie doch bereits einen Hinweis im Sinne einer Verschlechterung der Stoffwechselsituation anzeigt, oder daß allein das Bestehen einer Schwangerschaft mit dem diabetogenen Einfluß der vermehrten Glucocorticoidbildung die Verschlechterung der Insulinwerte bewirkt. Letztere Deutung ist auf Grund der Ergebnisse anderer Autoren (34, 35) die erhöhte Seruminsulinspiegel während der Gravidität feststellten, wahrscheinlicher.

In der folgenden kurz gehaltenen Übersichtstabelle sollen die Mittelwerte aller Gruppen wiedergegeben werden. Dabei ist nach allen bisherigen Erfahrungen als pathologisches Verhalten anzusehen, wenn hohe Seruminsulinwerte (gesamt, frei oder gebunden) vorliegen und ein verzögerter Anstieg der Werte des freien Insulins erfolgt.

Insulinwerte in $\mu\text{E}/\text{ml}$	Gruppe 1 (Ennemoser)	Gruppe 1 (Krakau)	Gruppe 2 (Krakau)	Gruppe 2 (Ennemoser)
Gesamtinsulin (nüchtern)	123	163	213	189
gebundenes Insulin (nüchtern)	80	137	167	138
freies Insulin (nüchtern)	43	26	46	51
Gesamtinsulin (60 Min. nach Glucose)	202	240	279	352
gebundenes Insulin (60 Min. nach Glucose)	105	186	206	230
freies Insulin (60 Min. nach Glucose)	97	54	73	122
Gesamtinsulin (120 Min. nach Glucose)	153	189	270	346
gebundenes Insulin (120 Min. nach Glucose)	93	155	152	163
freies Insulin (120 Min. nach Glucose)	60	34	118	183

Aus dieser Tabelle ist zu entnehmen, daß der oben besprochene Trend von Gruppe 1 (ENNEMOSER) über Gruppe 1 (KRAKAU) und der Gruppe 2 (KRAKAU) zu Gruppe 2 (ENNEMOSER) im wesentlichen besteht. So ist bei den Werten der Gesamt-ILA 60 und 120 Minuten nach Glucosebelastung ein beständiger Anstieg der Insulinwerte in der aufgezeigten Richtung festzustellen. Lediglich bei den Nüchternbestimmungen sind die Werte der Gruppe 1 (KRAKAU) höher als die Werte der Gruppe 2 (ENNEMOSER), ohne daß dies den aufgezeigten Trend wesentlich zu stören vermag. Man könnte sich vorstellen, daß schwangere Frauen - vor allem mit einer Prädiabetesbelastung - ebenso wie Cushingpatienten, von vornherein höhere Seruminsulinspiegel haben, um den diabetogenen Effekt der Glucocorticoide besser auszugleichen. Nach Glucosebelastung haben sich aber die mehr pathologischen Werte bei jenen Frauen ergeben, die stärker im Sinne eines Prädiabetes belastet, wenn auch nicht schwanger sind (Gruppe 2 ENNEMOSER). Diese Feststellung kann keine Erklärung des Phänomens sein,

sondern lediglich einen Hinweis dafür darstellen, in welcher Richtung die Ergebnisse gedeutet werden können. Völlig gleichartig wie bei der Gesamt-ILA sind die Verhältnisse beim gebundenen Insulin, und zwar einschließlich der erwähnten Ausnahme bei den Nüchternwerten. Von besonderem Interesse ist aber nun, daß der von ENNEMOSER erstmals gezeigte Befund eines starken, aber verzögerten Anstiegs des freien Insulins bei im Sinne eines Prädiabetes besonders gefährdeten Frauen auch durch unsere Untersuchungen bei einem Kollektiv völlig anderer Zusammensetzung bestätigt werden konnte. Aus Abb. 2 ist zu entnehmen, daß eine signifikante Differenz zwischen den Werten des durch Antikörper unterdrückbaren Insulins zwischen unserer Gruppe 1 und Gruppe 2 (120 Minuten nach Glucosebelastung) besteht. Dabei konnten wir ebenso wie ENNEMOSER zeigen, daß sich der Anstieg des freien Insulins nach 120 Minuten gegenüber dem 60-Minuten-Wert fortsetzt, während sonst, bei den weniger im Sinne eines Prädiabetes belasteten Frauen - die Werte des freien Insulins nach 60 Minuten wieder absinken. Nur der Vollständigkeit halber sei hinzugefügt, daß die eine in der Kasuistik aufgeführte Patientin, bei der die pathologisch verlaufende Glucosebelastungsprobe einen latenten Diabetes erkennen läßt, auch prompt im Sinne des von uns beschriebenen Trends besonders hohe Werte der Gesamt-ILA und der verzögerten Freisetzung des freien Insulins nach 120 Minuten aufweist.

Insgesamt vier Frauen wurden sowohl von uns während der Schwangerschaft als auch von ENNEMOSER nach der Entbindung untersucht. Dabei ergab sich, daß in drei Fällen erheblich höhere Seruminsulinspiegel im Nüchternzustand und nach Belastung festzustellen waren. Lediglich bei einer Frau waren die Seruminsulinwerte während der Schwangerschaft etwas niedriger als während des Wochenbettes. Diese kleine Zahl gemeinsam untersuchter Frauen erlaubt nicht mehr als einen Hinweis darauf, daß der bekannte diabetogene Effekt der Schwangerschaft seinen Ausdruck auch in den Seruminsulinwerten findet und daß sich diese Verhältnisse nach der Entbindung rasch zu normalisieren scheinen.

Zusammengefaßt läßt sich also folgendes feststellen:

1. Die Diaphragmamethode erwies sich auch bei unseren Untersuchungen als relativ ungenau und konnte nur allgemeine Hinweise auf die nach Glucoseapplikation eintretende vermehrte Insulinsekretion geben.
2. Wie schon von anderen Autoren festgestellt, lassen sich mit der Insulinbestimmungsmethode am epididymalen Fettgewebe der Ratte bei gleichzeitiger Differenzierung von mit Antiserum unterdrückbarem und nicht unterdrückbarem Insulin interessante Befunde erheben.
3. Bei zunehmendem Verdacht auf einen Prädiabetes anhand der klinischen

Symptome finden sich höhere Werte der Gesamt-ILA und des gebundenen Insulins vor und nach der Glucosebelastung, sowie ein besonders auffallender, hochsignifikanter, verzögerter Anstieg des freien, d. h. mit Antiserum unterdrückbaren Insulins.

4. Ob die auf diese Weise festgestellten Abweichungen bei schwangeren Frauen mit Glucosurie (ohne Zeichen eines Prädiabetes oder latenten Diabetes) bereits doch einen ersten Anhalt für eine sich anbahnende Stoffwechselstörung aufzeigen, kann nicht sicher entschieden werden. Hierzu wären Untersuchungen an Schwangeren ohne Glucosurie und nicht schwangeren Frauen ohne Glucosurie erforderlich. Immerhin bestätigen unsere Untersuchungen den auch gerade in letzter Zeit oft geäußerten Verdacht, daß die sogenannte harmlose Schwangerschaftsglucosurie einer sehr sorgfältigen Abklärung und weitere Kontrollen dieser Frauen verlangt, auch wenn eine erste Glucosebelastungsprobe keine pathologischen Abweichungen zeigt.

V. Zusammenfassung

Bei schwangeren Frauen mit einer Glucosurie, jedoch mit einer normalen Glucosetoleranz wurden Untersuchungen durchgeführt, die Auskunft über ein möglicherweise pathologisches Verhalten der Seruminsulinaktivität geben sollten. Zu diesem Zweck wurden die Schwangeren in zwei Gruppen eingeteilt; die Gruppe 1 umfaßte Frauen, die lediglich eine Glucosurie aufwiesen, während die Schwangeren der Gruppe 2 neben der Glucosurie auch verdächtige Symptome im Sinne eines Prädiabetes (positive Familienanamnese oder Geburt überschwerer Kinder) zeigten. Bei diesen Untersuchungen erwies sich erneut die Überlegenheit der Fettgewebsmethode gegenüber dem Insulinbestimmungsverfahren am Diaphragma, das nur geeignet ist, einen allgemein orientierenden Überblick zu geben. Die mit der Fettgewebsmethode erzielten Resultate ließen folgende Gesetzmäßigkeit erkennen: Je stärker der Verdacht auf das Vorliegen eines Prädiabetes ist, umso höhere Werte der Aktivität des gesamten und gebundenen Insulins finden sich vor und nach der Belastung mit Glucose. Außerdem kommt es bei den auf einen Diabetes verdächtigen Schwangeren zu einer verzögerten, erst nach 120 Min. einsetzenden, signifikant stärkeren Ausschüttung von freiem Insulin, womit sich eine gewisse Starre der Insulinsekretion bereits andeutet. Diese Befunde werden verglichen mit Ergebnissen, die an einem anders zusammengesetzten Patientinnengut Hinweise in ähnlicher Richtung ergeben haben. Die Problematik der derzeitig aktuellen biologischen und radioimmunologischen Insulinbestimmungsmethoden wird an Hand des vorliegenden Schrifttums diskutiert,

IV. Literaturverzeichnis

1. FROESCH, E.R., H. BÜRGI, E.B. RAMSEIER, P. BALLY and A. LABHART:
 Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity.
 J. of clin. Invest., 1963, 42, 1816

2. HUMBEL, R.E.
 Messung der Serum-Insulin-Aktivität mit epididymalem Rattenfettgewebe in vitro.
 Experimentia, 1959, XV/7, 256

3. GELLHORN, E., J. FELDMAN and A. ALLEN:
 A technique for the assay of small quantities of insulin using alloxan diabetic, hypophysectomized, adrenalectomized rats.
 Endocrinology, 1941, 29, 849

4. BEIGELMAN, P.M., F.C. GOETZ, H.N. ANTONIADES and G.W. THORN:
 Insulin-like activity of human plasma constituents.
 Metabolism, 1956, 5, 35

5. GROEN, J., C.E. KAMMINGA, A.F. WILLEBRANDS and J.R. BLICKMAN:
 Evidence for the presence of insulin in bloodserum. A method for an approximate determination of the insulin content of blood.
 J. of clin. Invest., 1952, 31, 97

6. WILLEBRANDS, A.E. and J. GOREN:
 Determination of serum insulin by rat diaphragma method; further observations in diabetic and non-diabetic subjects and in hyperinsulinism.
 Diabetes, 1956, 5, 378.

7. WILLEBRANDS, A.E., H. v. d. GELD and J. GROEN:
 Determination of serum insulin using the isolated rat diaphragma. The effect of serum dilution.
 Diabetes, 1958, 7, 119.

8. VALLANCE-OWEN, J., B. HURLOCK and N. PLEASE:

Plasma-insulin activity in diabetes mellitus, measured by the rat diaphragma technique.

Lancet, 1955, 2, 583.

9. RANDLE, P.J.:

Assay of plasma insulin activity by the rat diaphragma method.

Brit. med. J., 1954, 1, 1237.

10. RANDLE, P.J.:

Insulin in blood.

J. of Endocr., 1956, 14, 82.

11. HAUSBERGER, F. X., S. W. MILSTEIN and R. J. RUTMAN:

The influence of insulin on glucose utilization in adipose and hepatic tissues in vitro.

J. of biol. Chem., 1954, 208, 431.

12. HAUSBERGER, F. X. and S. W. MILSTEIN:

Dietary effects on lipogenesis in adipose tissue.

J. of biol. Chem., 1955, 214, 483.

13. MILSTEIN, S. W. and F. X. HAUSBERGER:

Lipogenesis and carbohydrate utilisation. Effect of glucose concentration and insulin in rat liver and adipose tissue.

Diabetes, 1956, 5, 89.

14. RENOLD, A. E., A. MARBLE and D. W. FAWCETT:

Action of insulin on deposition of glucagon and storage of fat in adipose tissue.

Endocrinology, 1950, 46, 55.

15. HAUSBERGER, F. X.:

Action of insulin and cortisone on adipose tissue.

Diabetes, 1958, 3, 211.

16. HAUSBERGER, F. X.:

Influence of insulin and cortisone on hepatic and adipose tissue metabolism of rats.

Endocrinology, 1958, 1, 14.

17. FELLER, D. D. and E. FEIST:

Metabolism of adipose tissue. 11. Incorporation of propionate carbon into lipides by slices of adipose tissue.

J. of biol. Chem., 1957, 228, 275.

18. HUMBEL, R. E., M. STAUB and R. E. FROESCH:

Der Einfluß von Insulin und oralen Antidiabetica auf die Glucoseaufnahme und den Gasaustausch von isoliertem Fettgewebe.

Schweiz. med. Wschr., 1959, 14, 381.

19. MILSTEIN, S. W.:

Oxidation of specifically labeled glucose by rat adipose tissue.

Proc. soc. exp. Biol., 1956, 92, 632.

20. DITSCHUNEIT, H., CHANG-SU AHN, M. PFEIFFER und E. F. PFEIFFER:

Über die Bestimmung von Insulin im Blut am epididymalen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glucose.

Klin. Wschr., 1959, 37, 1234.

21. WEINGES, K. F. und H. WÖRNER:

Über den Einfluß von Insulin und Glucagon auf den Glucosestoffwechsel des epididymalen Fettanhangs der Ratte.

Klin. Wschr., 1961, 39/1, 238.

22. RENOLD, A. E., D. B. MARTIN, Y. M. DAGENALS, J. STEINKE, R. J. NICKERSON and M. C. SHEPS:

Measurements of small quantities of Insulin-like-activity using rat adipose tissue.

J. clin. Invest., 1960, 39, 1487.

23. MARTIN, D. B., A. E. RENOLD and Y. M. DAGENAIS:

An assay for insulin-like-activity using rat adipose tissue.

Lancet, 1958, 2, 76.

24. WINEGRAD, A.I. and A.E. RENOLD:

Studies on rat adipose tissue in vitro.
J. of biol. Chem., 1958, 233, 267.

25. ABRAHAM, S., P.F. HIRSCH and I.L. CHAIKOFF:

The quantitative significance of glycolysis and non-glycolysis in glucose utilization by rat mammary gland.
J. of biol. Chem., 1954, 211, 31.

26. BALL, E.G. and M.A. MERRILL:

A manometric assay of insulin and some results of the application of the method to sera and islet-containing tissues.
Endocrinology, 1961, 69, 596.

27. FROESCH, E.R., P. BALLY, U. GUHL, E.B. RAMSEIER and A. LABHART:

Die Wirkung des Glucagons auf das Fettgewebe.
Schweiz. med. Wschr., 1960, 90, 1329

28. WINEGRAD, A.I., W.N. SHAW, F.D.W. LUKENS, W.C. STADIE and A.E. RENOLD:

Effects of growth-hormone in vitro on the metabolism of glucose in rat adipose tissue.
J. of biol. Chem., 1959, 234, 1922.

29. CAHILL, G.F., J.B. LEBOEUF and R.B. FLINN:

Studies on rats adipose tissue in vitro. VI. Effects of epinephrine on glucose metabolism.
J. of biol. Chem., 1960, 235, 1246.

30. YALOW, R.S. and S.A. BERSON:

Immunoassay of endogenous plasma insulin in men.
J. clin. Invest., 1960, 39, 1157.

31. VALLANCE-OWEN, J. and B. HURLOCK:

Estimation of plasma insulin by the rat diaphragma method.
Lancet, 1954, 1, 68.

32. PFEIFFER, E.F., M. PFEIFFER, H. DITSCHUNEIT and C. AHN:

Clinical and experimental studies of insulin secretion following tolbutamid and metahexamid administration.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1959, 82, 479.

33. ENNEMOSER, D.:

Med. Inaug. Dissert.

München (1965).

34. LEAKE, H.N. and R.L. BURT:

Serum insulin-like activity after tolbutamide during pregnancy and early puerperium.

Obstet. and Gynec., 1965, 25, 245.

35. BLEICHER, S.J., J.B.O'SULLIVAN and N. FREINKEL:

Carbohydrate metabolism in pregnancy.

V. The interrelations of glucose, insulin and free fatty acids in late pregnancy and post partum.

New Engl. J. Med., 1964, 271, 866.

Herrn Professor Dr. W. SEITZ (Med. Universitäts-Poliklinik) und Herrn Professor Dr. LAMPRECHT (Biochemisches Labor der Technischen Hochschule in München-Pasing) danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung der experimentellen Untersuchungen. Herrn Professor Dr. R. FIKENTSCHER (Direktor der II. Universitäts-Frauenklinik) danke ich für die Überlassung des Patientengutes.

Herrn Priv.-Dozent Dr. H. MEHNERT (Med. Universitäts-Poliklinik) und Herrn Dr. F. DITTMAR (II. Universitäts-Frauenklinik, Direktor Professor Dr. R. FIKENTSCHER) gilt mein besonders herzlicher Dank für die Überlassung des Themas und die verständnisvolle Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Dr. G. SCHÄFER möchte ich für seine zahlreichen Ratschläge meinen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Ich, Gisela Krakau, wurde als Tochter des Generals August Krakau und seiner Ehefrau Elisabeth, geborene Kempfer, am 15. September 1939 in Amberg/Opf. geboren. Dort besuchte ich ab 1945 die Volksschule und trat im Herbst 1949 in das Mädchen-Realgymnasium der Armen Schulschwestern ein, wo ich im Sommer 1959 die Reifeprüfung ablegte. Anschließend studierte ich drei Semester Naturwissenschaften (Biologie, Chemie) an der Universität Erlangen. Nach dem Studienwechsel legte ich ein Semester später an der gleichen Universität die naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach weiteren drei Semestern, im Februar 1963, die ärztliche Vorprüfung ab. Die ersten zwei klinischen Semester verbrachte ich in Innsbruck. Seither studiere ich an der Universität München. Ich beabsichtige, nach dem Wintersemester 1965/66 das Medizinstudium mit dem Staatsexamen abzuschließen.

